



ALTERAÇÕES NA TAXA DE MORTALIDADE INDUZIDAS POR CAFEÍNA EM *Drosophila melanogaster*

José Wellington Macêdo Viana^{1*}, Rita de Cássia Gonçalves de Lima², Jean Paul Kamdem³

Resumo: Estudos demonstraram que a cafeína, um alcaloide purina natural encontrado em mais de 60 tipos de plantas, tem sido associada com a redução do estresse oxidativo, sendo capaz de inibir a peroxidação lipídica nas células. No entanto, dependendo da dosagem e da frequência de uso, a cafeína pode ser tóxica para humanos e animais. Pesquisas usando modelos invertebrados demonstraram que altas doses de cafeína contribuem no aumento dos níveis de estresse oxidativo, desencadeando mudanças comportamentais e diminuição da expectativa de vida. Neste contexto, objetivou-se avaliar as alterações na taxa de mortalidade induzidas por cafeína em *Drosophila melanogaster*. Para tanto, foram utilizadas moscas machos e fêmeas, com 1 a 3 dias de vida, expostas à dieta suplementada com concentrações crescentes de cafeína (10, 25, 50 e 100 mM) durante 7 dias. A contagem do número de moscas mortas foi registrada diariamente e os testes foram realizados em triplicata. Ao final do período de exposição, foi possível perceber que a concentração de 100 mM de cafeína foi a mais tóxica para as moscas, evidenciado pelo aumento na taxa de mortalidade quando comparado ao grupo controle e aos demais grupos testados.

Palavras-chave: Cafeína. Taxa de Mortalidade. Toxicidade. Moscas.

MORTALITY RATE ALTERATIONS INDUCED BY CAFFEINE IN *Drosophila melanogaster*

Abstract: Studies have shown that caffeine, a natural purine alkaloid found in more than 60 types of plants, has been associated with the reduction of oxidative stress, being able to inhibit lipid peroxidation in cells. However, depending on the dosage and frequency of use, caffeine can be toxic to humans and animals. Research using invertebrate models has shown that high doses of caffeine contribute to increased levels of oxidative stress, triggering behavioral changes and decreasing life expectancy. In this context, the objective of this study was to evaluate the changes in the mortality rate induced by caffeine in *Drosophila melanogaster*. For that, male and female flies were used, with 1 to 3 days of life and exposed to diet supplemented with increasing concentrations of caffeine (10, 25, 50 and 100 mM) for 7 days. The count of the number of dead flies was recorded daily and the tests were carried out in triplicate. At the end of the exposure period, it was possible to notice that the concentration of 100 mM of caffeine was the most toxic for the flies, evidenced by the increase in the mortality rate when compared to the control group and the other groups tested.

Keywords: Caffeine. Mortality Rate. Toxicity. Flies.

¹ Pós-graduando EAD pela Faculdade Venda Nova do Imigrante - FAVENI

² Graduanda Curso de Licenciatura em C. Biológicas, Universidade Regional do Cariri - URCA

³ Docente Depto. C. Biológicas, Universidade Regional do Cariri - URCA

*Autor correspondente: wellingtonmacedo1819@gmail.com

Recebido: 28/07/2020; Aceito: 19/09/2020

Introdução

A cafeína (CAF), ou 1,3,7-trimetilxantina, é uma das principais substâncias psicoativas mais frequentemente consumidas em todo o mundo (LIU *et al.*, 2017), sendo um alcaloide purina natural encontrado em folhas, sementes e frutos de mais de 60 tipos de plantas, incluindo o café (*Coffea* sp.) (MAGUIRE *et al.*, 2017). A CAF também é encontrada em uma variedade de medicamentos e suplementos dietéticos, assim como nas populares bebidas energéticas, nas quais a cafeína sintética é adicionada para melhorar suas propriedades estimulantes sob o sistema nervoso, promovendo um maior estado de alerta e energia (WIKOFF *et al.*, 2017; TEMPLE *et al.*, 2017).

Além de suas propriedades estimulantes, estudos demonstraram que a CAF tem sido associada com a redução do estresse oxidativo devido à sua capacidade de neutralizar Espécies Reativas de Oxigênio e inibir a peroxidação lipídica nas membranas das células (MISHRA; KUMAR, 2014; MARTINI *et al.*, 2016; ENDESFELDER *et al.*, 2019; BARCELOS *et al.*, 2020), além de reduzir a produção de proteína β -amiloide em humanos com doença de Alzheimer (SANTOS *et al.*, 2010; KOLAHDOUNAN; HAMADEH, 2017). De fato, pesquisas revelaram que os antioxidantes estão associados com a baixa incidência de diversas doenças, incluindo as degenerativas e coronárias, agindo diretamente ao eliminar as espécies reativas e aumentar as defesas antioxidantes endógenas do organismo (KURUTAS, 2016; AHSAN, F.; BASHIR 2019; KACZMARCZYK-SEDLAK *et al.*, 2019).

Apesar disso, evidências científicas apontam que substâncias com propriedades antioxidantes como a CAF podem promover efeitos adversos no organismo a depender da dosagem e da frequência de uso (CARAVAN *et al.*, 2016; WILLSON, 2018), sendo que dosagens excessivas contribuem para o desenvolvimento de alterações fisiológicas diversas, principalmente relacionadas aos sistemas nervoso, cardiovascular e renal (ALMOSAWI *et al.*, 2018; BARCELOS *et al.*, 2020). De fato, a remoção completa das espécies reativas (de oxigênio e nitrogênio) por suplementação com substâncias antioxidantes pode perturbar as vias de sinalização celular e aumentar o risco de doenças crônicas, tendo em vista que as espécies reativas desempenham papéis cruciais para manutenção do funcionamento normal das células quando em níveis citostáticos, contribuindo para a viabilidade e processos celulares básicos como diferenciação e proliferação celular (MITTLER *et al.*, 2011; MITTLER, 2017; VIANA *et al.*, 2020).

Estudos utilizando espécies de invertebrados como modelos animais alternativos na

pesquisa científica, incluindo a popular mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster*, demonstraram que concentrações acima de 50 mM de CAF podem contribuir para aumentar os níveis de estresse oxidativo, desencadeando mudanças comportamentais e diminuição da expectativa de vida, além de resultar em efeitos negativos sobre a atividade locomotora, aprendizado e sono (SI; ZHANG; MALESZKA, 2015; MUSTARD, 2014; KO *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2018; Da SILVA *et al.*, 2018; ONAOLAPO; ONAOLAPO, 2020).

A espécie *D. melanogaster* vem sendo amplamente empregada nos últimos anos como modelo animal invertebrado alternativo para entender a toxicidade de vários compostos em diferentes sistemas biológicos (MUNOZ-SORIANO; PATRICIO, 2011; ABOLAJI *et al.*, 2013; VRAILAS-MORTIMER *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2019). Neste contexto, destacam-se estudos que procuraram avaliar a toxicidade da CAF sob alterações comportamentais, expectativa de vida e taxa de mortalidade em *D. melanogaster* (BONILLA *et al.*, 2006; BAHADORANI *et al.*, 2008; MUSTARD *et al.*, 2012; KEEBAUGH *et al.*, 2017). Diante do exposto, o presente estudo objetivou avaliar as alterações na taxa de mortalidade induzidas por CAF em *D. melanogaster*.

Material e Métodos

Espécie-Alvo

Para a realização dos protocolos experimentais, foram utilizadas moscas machos e fêmeas da espécie *D. melanogaster*, com 1 a 3 dias de idade, obtidas do Laboratório de Biologia e Toxicologia (BIOTOX) da Universidade Regional do Cariri - URCA.

Formulação da Dieta

As moscas foram mantidas em frascos de vidro contendo meio de cultura constituído por 1 kg de cuscuz (fubá), 50 g de soja moída, 50 g de leite em pó, 50 g de açúcar e 10 g de sal, mantidos em um ciclo claro/escuro de 12/12 horas, sob temperatura e umidade constante (25 ± 15°C; 60% respectivamente), conforme descrito por Abolaji *et al.*, (2013) e adaptado por Nunes *et al.*, (2019) e Viana *et al.*, (2020).

Grupos Experimentais

As moscas foram expostas à dieta suplementada com diferentes concentrações de CAF (10, 25, 50 e 100 mM) durante o período de 7 dias (1 semana) para testar o efeito destas concentrações na taxa de mortalidade das drosófilas. A avaliação da taxa de mortalidade se baseia na contagem diária do número de moscas mortas durante o período de exposição considerado, geralmente de 7 dias.

Ao final da exposição, foi possível obter uma média do número cumulativo de mortes registradas ao longo de uma semana. Os testes experimentais foram realizados em triplicata e os grupos foram divididos da seguinte forma: Grupo I (Controle): Moscas sem dieta suplementada com CAF; Grupos II ao V: Moscas expostas à dieta suplementada com concentrações crescentes de CAF (10, 25, 50 e 100 mM), respectivamente.

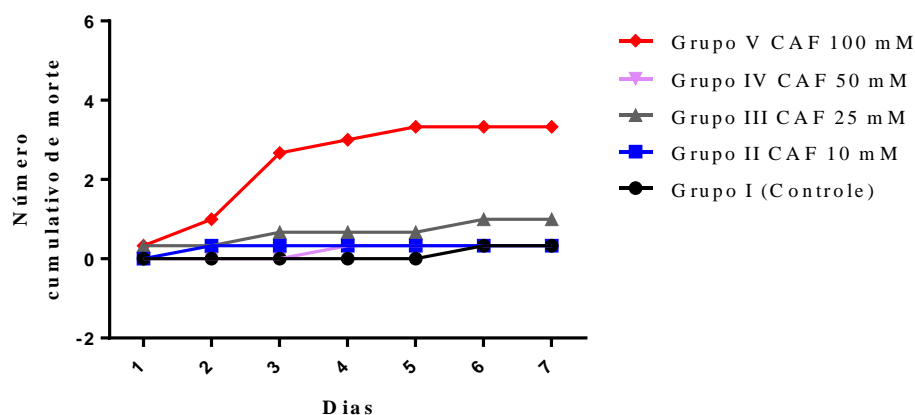
Análise Estatística

A análise estatística foi realizada mediante Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Benferroni, empregando a ferramenta estatística GraphPad Prism, versão 6.0. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Conforme o esperado, a concentração de 100 mM de CAF mostrou-se a mais tóxica para as moscas, com aumento na taxa de mortalidade quando comparada com o grupo controle (Grupo I) durante o período de exposição de 7 dias ($p < 0,05$). As demais concentrações apresentaram efeitos menos significativos, especialmente ao se considerar os padrões de atividade locomotora, quando comparado ao grupo V (CAF 100 mM) e ao grupo I (controle). Além disso, pelo gráfico, é possível perceber que a menor concentração de CAF (10 mM) testada praticamente não causou alterações na taxa de mortalidade das moscas, fato evidenciado pelo número cumulativo de morte relativamente reduzido (Figura 1).

Figura 1: Taxa de mortalidade das moscas expostas à dieta suplementada com concentrações crescentes de cafeína (CAF) durante o período de exposição de 7 dias.



Fonte: Gráfico elaborado pelos autores.

Interessantemente, as moscas do grupo IV (que tiveram dieta suplementada com CAF na concentração de 50 mM) praticamente não sofreram alterações na taxa de mortalidade durante o período de exposição à CAF, no qual o número de moscas mortas permaneceu constante a partir do terceiro dia de exposição. Em contraste, no grupo exposto à dieta suplementada com CAF na concentração de 25 mM (grupo III), houve relativo aumento na taxa de mortalidade em comparação ao grupo IV e o controle ($p < 0,05$). Estes resultados aparentemente incongruentes serão dignos de nota em experimentos ulteriores. Não obstante, alguns estudos já haviam demonstrado previamente que a concentração de 50 mM de cafeína é uma dose-dependente limiar em que, acima disso, ocorrem alterações significativas nos padrões fisiológicos e comportamentais de invertebrados como a *Drosophila* (SI; ZHANG; MALESZKA, 2005; MUSTARD, 2014; KO *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2018).

De fato, isto está de acordo com os resultados demonstrados aqui, em que, acima de 50 mM de cafeína, a taxa de mortalidade das moscas foi relativamente aumentada. Como destacado, a concentração de 100 mM foi a que mais afetou negativamente a taxa de mortalidade das moscas, mas nem sempre esta concentração se mostra relativamente tóxica para animais invertebrados usados como espécies-modelo em pesquisas toxicológicas (MUSTARD *et al.*, 2012; Da SILVA *et al.*, 2018).

Nikitin e colaboradores (2018) relataram efeitos negativos da cafeína sob alterações na

expectativa de vida de *D. melanogaster* a depender da dosagem utilizada, respaldando o fato acima mencionado de que altas concentrações de cafeína podem reduzir a longevidade das moscas. Além disso, foi relatado que o excesso de cafeína altera os padrões normais de atividade locomotora e sono em *Drosophila*, bem como o desempenho do mecanismo de geotaxia negativa (HENDRICKS *et al.*, 2000; SHAW *et al.*, 2000; ANDRETIC *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2010; NALL *et al.*, 2016; KEEBAUGH *et al.*, 2017). Em parte, os resultados destes estudos corroboram com os apresentados aqui ao demonstrar que a CAF causa alterações na taxa de mortalidade das moscas *Drosophila melanogaster* quando em altas concentrações.

Conclusão

Em suma, a cafeína (CAF) quando em altas concentrações (100 mM ou acima disso) é tóxica para as moscas, fato evidenciado pelo aumento na taxa de mortalidade ao final do período de exposição. Mesmo assim, não podemos generalizar os fatos, uma vez que a concentração de 50 mM (considerada alta por alguns autores) praticamente não causou efeitos sob a taxa de mortalidade das moscas, em contraste com o aumento da taxa de mortalidade na concentração de 25 mM, como demonstrado em nossos experimentos. Faz-se necessário, pois, realizar mais estudos a fim de melhor esclarecer estes achados.

Referências

ABOLAJI, A. O.; KAMDEM, J. P.; FAROMBI, E. O.; ROCHA, J. B. T. *Drosophila melanogaster* as a promising model organism in toxicological studies: a mini review. **Archives of Basic and Applied Medicine**, v. 1, p. 33-38, 2013.

ALMOSAWI, S.; BAKSH, H.; QAREEBALLA, A.; FALAMARZI, F.; ALSALEH, B.; ALRABAANI, M.; ALKALBANI, A.; MAHDI, S.; KAMAL, A. Acute administration of caffeine: the effect on motor coordination, higher brain cognitive functions, and the social behavior of BLC57 Mice. **Behavioural Science**, v. 8, n. 65, p. 01-11, 2018.

AHSAN, F.; BASHIR, S. Coffee Consumption: health perspectives and drawbacks. **Journal of Nutrition and Obesity**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2019.

ANDRETIC, R.; KIM, Y. C.; JONES, F. S.; HAN, K. A.; GREENSPAN, R. J. *Drosophila* D1 dopamine receptor mediates caffeine-induced arousal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, p. 20392–20397, 2008.

BAHADORANI, S.; BAHADORANI, P.; PHILLIPS, J. P.; HILLIKER, A. J. The effects of vitamin supplementation on *Drosophila* life span under normoxia and under oxidative stress. **Journal of Gerontology: Biological Sciences**, v. 63, n. 1, p. 35–42, 2008.

BARCELOS, R. P.; LIMA, F. D.; CARVALHO, N. R.; BRESCIANI, G.; ROYES, L. F. F. Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and on exercise performance. **Nutrition Research**. 2020. Disponível em: www.sciencedirect.com. Acesso em: 24 jul. 2020.

BONILLA, E.; MEDINA-LEENDERTZ, S.; VILLALOBOS, V.; MOLERO, L.; BOHÓRQUEZ, A. Paraquat-induced oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: effects of melatonin, glutathione, serotonin, minocycline, lipoic acid and ascorbic acid. **Neurochemistry Research**, v. 31, p. 1425–1432, 2006.

CARAVAN, I.; SEVASTRE BERGHIAN, A.; MOLDOVAN, R.; DECEA, N.; ORASAN, R.; FILIP, G. A. Modulatory effects of caffeine on oxidative stress and anxiety-like behaviour in ovariectomized rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 94, p. 961-972, 2016.

CHEN, Y. W.; HUANG, Y. H.; WEN, C. C.; WANG, Y. H.; CHEN, W. L.; CHEN, L. C.; TSAY, H. J. Movement disorder and neuromuscular change in zebrafish embryos after exposure to caffeine. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 30, n. 5, p. 440-447, 2018.

Da SILVA, C. S.; LIMA, R. C. G.; ELEKOFEHINTI, O. O.; OGUNBOLUDE, Y.; DUARTE, A. E.; ROCHA, J. B. T.; MENEZES, I. R. A.; BARROS, L. M.; TSOPMO, A.; LUKONG, K. E.; KAMDEM, J. P. Caffeine-supplemented diet modulates oxidative stress markers and improves locomotor behaviour in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*. **Chemical-Biological Interactions**, v. 12, p. 01-08, 2018.

ENDESFELDER, S.; STRAUß, E.; SCHEUER, T.; SCHMITZ, T.; BÜHRER, C. Antioxidative effects of caffeine in a hyperoxia-based rat model of bronchopulmonary dysplasia. **Respiratory Research**, v. 20, n. 88, p. 01-13, 2019.

HENDRICKS, J. C.; FINN, S. M.; PANCKERI, K. A.; CHAVKIN, J.; WILLIAMS, J. A.; SEHGAL, A.; PACK, A. I. Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. **Neuron**, v. 25, n. 1, p. 129–138, 2000.

KACZMARCZYK-SEDLAK, I.; FOLWARCZNA, J.; SEDLAK, L.; ZYCH, M.; WOJNAR, W.; SZUMIŃSKA, I.; WYGŁĘDOWSKA-PROMIENSKA, D.; MRUKWA-KOMINEK, E. Effect of caffeine on biomarkers of oxidative stress in lenses of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Archives of Medical Sciences**, v.15, n. 4, p. 1073-1080, 2019.

KEEBAUGH, E. S.; PARK, J. H.; SU, C. B. S.; YAMADA, R.; WILLIAM, W. J. Nutrition influences caffeine-mediated sleep loss in *Drosophila*. **SLEEP**, v. 40, n. 11, p. 01-09, 2017.

KO, B. S.; AHN, S. H.; NOHC, D. O.; HONG, D. K. B.; HANE, S. H.; SUH, H. J. Effect of explosion-puffed coffee on locomotor activity and behavioural patterns in *Drosophila melanogaster*. **Food Research International**, v. 100, p. 252–260, 2017.

KOLAHDOUZAN, M.; HAMADEH, M. J. The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. **CNS Neuroscience Therapeutic**, v. 23, p. 272–290, 2017.

KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 71, p. 01-22, 2016.

LIN, F. J.; PIERCE, M. M.; SEHGAL, A.; WU, T.; SKIPPER, D. C.; CHABBA, R. Effect of taurine and caffeine on sleep–wake activity in *Drosophila melanogaster*. **Nature and Science of Sleep**, v. 2, p. 221–231, 2010.

LIU, Q. S.; DENG, R.; FAN, Y.; LI, K.; MENG, F.; LI, X.; LIU, R. Low dose of caffeine enhances the efficacy of antidepressants in major depressive disorder and the underlying neural substrates. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, p. 132-146, 2017.

MAGUIRE, A. R.; KUNCB, M.; HYRSLB, P.; KAVANAGH, K. Caffeine administration alters the behaviour and development of *Galleria mellonella* larvae. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 64, p. 37-44, 2017.

MARTINI, D.; DEL, B.; TASSOTTI, M.; RISO, P.; DEL RIO, D.; BRIGHENTI, F.; PORRINI, M. Coffee Consumption and Oxidative Stress: A Review of Human Intervention Studies. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 01-20, 2016.

MISHRA, J.; KUMAR, A. Improvement of mitochondrial NAD(+)/FAD(+)-linked state-3 respiration by caffeine attenuates quinolinic acid induced motor impairment in rats: implications in Huntington's disease. **Pharmacological Reports**, v. 66, p. 1148–1155, 2014.

MITTLER, R. ROS are good? **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; BREUSEGEM, F. V. ROS signaling: the new wave? **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 6, p. 300-309, 2011.

MUNOZ-SORIANO, V.; PATRICIO, N. *Drosophila* models of Parkinson's disease: discovering relevant pathways and novel therapeutic strategies. **Parkinson's Disease**, n. 11, p. 11-14, 2011.

MUSTARD, J. A.; DEWS, L.; BRUGATO, A.; DEY, K.; WRIGHT, G. A. Consumption of an acute dose of caffeine reduces acquisition but not memory in the honey bee. **Behavioural Brain Research**, v. 232, n. 1, p. 217-224, 2012.

MUSTARD, J. A. The buzz on caffeine in invertebrates: effects on behaviour and molecular mechanisms. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 8, p. 1375–1382, 2014.

NALL, A. H.; SHAKHMANTSIR, I.; CICHEWICZ, K.; BIRMAN, S.; HIRSH, J.; SEHGAL, A. Caffeine promotes wakefulness via dopamine signaling in *Drosophila*. **Scientific Reports**, v. 6, e20938 | DOI: 10.1038/srep20938. Disponível em: www.nature.com/scientificreports. Acesso em: 27 jul 2020.

NIKITIN, A. G.; NAVITSKAS, S.; GORDON, L. A. N. Effect of varying doses of caffeine on life span of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Gerontology: Biological Sciences**. v. 63A, n. 2, p. 149-150, 2018.

NUNES, R. G. S.; PEREIRA, P. S.; ELEKOFEHINTI, O. O.; FIDELIS, K. R.; DA SILVA, C. S.; IBRAHIM, M.; BARROS, L. M.; DA CUNHA, F. A. B.; LUKONG, K. E.; DE MENEZES,

I. R. A.; TSOPMO, A.; DUARTE, A. E.; KAMDEM, J. P. Possible involvement of transcriptional activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in the protective effect of caffeic acid on paraquat-induced oxidative damage in *Drosophila melanogaster*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 157, p. 161-168, 2019.

ONALAPO, O. J.; ONALAPO, A. Y. Caffeine, sleep, and antioxidant status. **Neurological Modulation of Sleep**, v. 1, p. 265-274, 2020.

SANTOS, C.; COSTA, J.; SANTOS, J.; VAZ-CARNEIRO, A.; LUNET, N. Caffeine intake and dementia: systematic review and meta-analysis. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, p. 187-204, 2010.

SHAW, P. J.; CIRELLI, C.; GREENSPAN, R. J.; TONONI, G. Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, n. 5459, p. 1834–1837, 2000.

SI, A.; ZHANG, S. W.; MALESZKA, R. Effects of caffeine on olfactory and visual learning in the honey bee (*Apis mellifera*). **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 82, n. 4, p. 664–672, 2015.

TEMPLE, J. L.; BERNARD, C.; LIPSHULTZ, S. E.; CZACHOR, J.D.; WESTPHAL, J. A.; MESTRE, M. A. The safety of ingested caffeine: a comprehensive review. **Frontiers in Psychiatry**, v. 8, n. 80, p. 01-19, 2017.

VIANA, J. W. M.; DE LIMA, R. C. G.; SILVA, J. R. L.; NUNES, R. G. S.; NETO, J. E.; BARROS, L. M. Protective Effect of Vitamin C against Behavioral, Histological Changes and Mortality Rate Induced by Paraquat in *Drosophila melanogaster*. **Austin Food Science**, v. 5, n. 1, 2020.

VRAILAS-MORTIMER, A.; GOMEZ, R.; DOWSE, H.; SANYAL, S. A survey of the protective effects of some commercially available antioxidant supplements in genetically and chemically induced models of oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. **Experimental Gerontology**, v. 47, p. 712–722, 2012.

WILLSON, C. The clinical toxicology of caffeine: a review and case study. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 1140-1152, 2018.

WIKOFF, A. D.; WELSH, B. T.; HENDERSON, R.; BRORBY, G. P.; BRITT, J.; MYERS, E.; GOLDBERGER, J.; LIEBERMAN, H. R.; O'BRIEN, C.; PECK, J.; TENENBEIN, M.; WEAVER, C.; HARVEY, S.; URBAN, J.; DOEPKER, C. Systematic review of the potential adverse effects of caffeine consumption in healthy adults, pregnant women, adolescents, and children. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 109, p. 585-648, 2017.

WU, M. N.; HO, K.; CROCKER, A.; YUE, Z.; KOH, K.; SEHGAL, A. The effects of caffeine on sleep in *Drosophila* require PKA activity, but not the adenosine receptor. **Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 11029–11037, 2009.

■